

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Bescheinigung

PEC'D	16 JUL 1996
WIPO	PCT

Die Herren Bernd W e r l e in Heidelberg/Deutschland und Johannes S c h u m a c h e r in Leimen/Deutschland haben eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Verfahren und Vorrichtung zur Bestimmung der Aktivität von Enzymen in Flüssigkeiten"

am 29. Juli 1995 beim Deutschen Patentamt eingereicht und erklärt, daß sie dafür die Innere Priorität der Anmeldung in der Bundesrepublik Deutschland vom 20. Juni 1995, Aktenzeichen 195 22 255.5, in Anspruch nehmen.

Der Wohnort des Mitanmelders Bernd W e r l e wurde berichtet in: Eppelheim/Deutschland.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Symbole C 12 Q und G 01 N der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 10. Juli 1996

Der Präsident des Deutschen Patentamts
Im Auftrag

reichen: 195 27 880.1

Eel

PRIORITY DOCUMENT

6433/P/001

Heidelberg, den 27. Juli 1995/j.s.



Patentanmeldung

der Herren

Bernd Werle
Konrad-Adenauer-Ring 6
69214 Eppelheim

Johannes Schumacher
Hildastraße 9
69181 Leimen

betreffend ein

"Verfahren und Vorrichtung zur Bestimmung der Aktivität von Enzymen in Flüssigkeiten"

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Bestimmung der Aktivität von Enzymen in Flüssigkeiten.

Die Bestimmung von Enzymaktivitäten in Pflanzenextrakten, Bakteriensuspensionen, Homogenanten und Körperflüssigkeiten, wie Serum, Plasma, Harn, bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit, Punktat, Liquor, Zelllinien oder auch homogenisiertem Gewebe, hat für die Diagnostik und zur Verlaufs- bzw. Therapiekontrolle ganz wesentliche Bedeutung erlangt.

Beispielsweise in Serum ist die Unterscheidung zwischen Enzymproteinen und den übrigen Serumproteinen auf chemischem Wege äußerst problematisch. Dabei ist zu berücksichtigen, daß die Konzentrationen der einzelnen Enzyme in Körperflüssigkeiten außerordentlich gering sind. So enthält das Serum eines gesunden Menschen $0,1 \mu\text{g}$ Glutamat-Oxal-Azetat-Transaminase im Milliliter. Zum Vergleich sei erwähnt, daß die Gesamteiweißkonzentration 60 bis 80 mg/ml Serum beträgt, d.h. die Konzentrationen verhalten sich etwa wie 1:700.000. Da die Bestimmung der Enzymkonzentrationen auf chemischem Wege problematisch ist, berechnet man ihre Aktivität aus der Geschwindigkeit, mit der die Umsetzung eines geeigneten Substrats erfolgt.

Aus der klinischen Chemie ist das sogenannte ELISA-Verfahren bekannt, bei dem auf immunologischem Wege die Konzentrationen eines Enzyms und des entsprechenden Enzym-Inhibitor-Komplexes in einer Gewebeprobe bzw. in einer Meßprobe erfaßt werden. Eine Messung der Enzymaktivität ist nach diesem Verfahren nicht möglich, da hier lediglich Konzentrationen gemessen werden, wobei nicht berücksichtigt wird, daß ein Enzym sowohl in aktiver als auch in inhibierter Form vorliegen kann.

Aus dem Stand der Technik sind Verfahren bekannt, bei denen einer Meßprobe zunächst die mit einem bestimmten Enzym korrespondierenden Enzym-Inhibitoren entzogen werden und anschließend

die Aktivität dieses Enzyms bestimmt wird. Die bekannten Verfahren sind sehr aufwendig, was einerseits auf die verwendeten Meßproben in Form von Gewebeproben zurückzuführen ist und andererseits auf die Vorgehensweise, wie die Enzym-Inhibitoren der Meßprobe entzogen werden. Dazu wird die Meßprobe mit einer Substanz versetzt, die die Enzym-Inhibitoren an sich bindet. Um die Enzym-Inhibitoren möglichst vollständig zu binden, muß die Substanz über eine bestimmte Dauer auf die Meßprobe einwirken, wobei eine möglichst homogene Mischung zwischen Meßprobe und Substanz aufrechterhalten werden muß. Anschließend müssen die so behandelte Meßprobe und die Substanz in einem Trennverfahren separiert werden.

Davon ausgehend liegt der Erfindung nun die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Bestimmung der Aktivität von Enzymen in Flüssigkeiten anzugeben, welche eine weitgehende bis vollständige Automatisierung und also eine Rationalisierung der Meßmethode ermöglichen.

Das erfindungsgemäße Verfahren löst die voranstehende Aufgabe durch die Merkmale des Patentanspruchs 1. Danach ist ein Verfahren zur Bestimmung der Aktivität von Enzymen in Flüssigkeiten, bei dem einer Meßprobe die mit mindestens einem Enzym korrespondierenden Enzym-Inhibitoren entzogen werden und bei dem die so behandelte Meßprobe mit einem Substrat versetzt wird, wobei das Substrat durch das Einwirken des Enzyms in Spaltprodukte aufgespalten wird und der Anstieg der Konzentration zu mindest eines Spaltprodukts des Substrats pro Zeiteinheit während einer Inkubationszeit erfaßt wird, so ausgestaltet, daß die Enzym-Inhibitoren der Meßprobe auf chromatographischem Wege entzogen werden.

Erfindungsgemäß ist erkannt worden, daß die Enzym-Inhibitoren der Meßprobe auch entzogen werden können, ohne daß eine möglichst homogene Mischung zwischen der entsprechenden Substanz

und der Meßprobe hergestellt werden muß und anschließend ein aufwendiger Trennvorgang vorgenommen werden muß. In diesem Zusammenhang ist erkannt worden, daß das Mischen und Trennen auch auf chromatographischem Wege aber praktisch in einem Verfahrensschritt durchgeführt werden können. Besonders vorteilhaft daran ist, daß mit dem erfindungsgemäßen Verfahren nunmehr Enzymaktivitäten von in flüssiger Form vorliegenden Meßproben, d.h. von Körperflüssigkeiten aller Art sowie von homogenisierten Gewebeproben, bestimmt werden können, wobei das Entziehen der Enzym-Inhibitoren auf chromatographischem Wege eine weitgehend automatisierte Verfahrensführung ermöglicht.

Dazu wird die Meßprobe in vorteilhafter Weise durch eine Säule mit einem chromatographischen Trägermaterial geleitet, wobei das Trägermaterial mit einer die Enzym-Inhibitoren bindenden Substanz versetzt ist. Dabei reichern sich die Enzym-Inhibitoren in der Säule an, so daß also gleichzeitig, quasi als Nebenprodukt des erfindungsgemäßen Verfahrens auch eine Isolation der Enzym-Inhibitoren erreicht wird.

Um nun die Meßergebnisse verschiedener Meßvorgänge miteinander vergleichen zu können, müssen definierte Versuchsbedingungen eingehalten werden. Dazu kann die behandelte Meßprobe, d.h. die von Enzym-Inhibitoren bereinigte Meßprobe, mit einem geeigneten Säulenpuffer definiert verdünnt werden. Außerdem kann der Meßprobe ein je nach den Versuchsbedingungen und zu bestimmenden Enzymaktivitäten geeigneter Meßpuffer beigemischt werden. In einer vorteilhaften Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens läßt sich das Meßassay, d.h. die zumeist verdünnte Meßprobe in Verbindung mit dem Testsubstrat, das durch Einwirken des zu bestimmenden Enzyms in Spaltprodukte aufgespalten wird, während der Inkubationszeit temperieren.

Grundsätzlich gibt es verschiedene Möglichkeiten, um den Anstieg der Konzentration zumindest eines Spaltprodukts des Sub-

strats pro Zeiteinheit während der Inkubationszeit zu erfassen. Besonders vorteilhaft ist es, den Anstieg der Konzentration fluorometrisch zu bestimmen, da sich auf diese Weise besonders gut der Zeitverlauf des Konzentrationsanstiegs verfolgen läßt.

Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe wird außerdem durch eine Vorrichtung zur Bestimmung der Aktivität von Enzymen in Flüssigkeiten mit den Merkmalen des Patentanspruchs 7 gelöst. Danach ist zur Behandlung einer Meßprobe eine Säule mit einem chromatographischen Trägermaterial vorgesehen, wobei das Trägermaterial mit einer Substanz versetzt ist, welche in der Meßprobe vorliegende, mit mindestens einem Enzym korrespondierende Enzym-Inhibitoren bindet. Dem einen Ende der Säule ist eine Zuführeinrichtung für Meßproben zugeordnet. In Flußrichtung der Meßprobe, d.h. der Säule nachgeschaltet ist eine Ventil/Pumpen-Anordnung angeordnet, mit der mindestens ein Versuchsgefäß mit einem Substrat und zumindest einem Teil der Meßprobe befüllbar ist. Schließlich ist noch ein Detektor zum Erfassen des Anstiegs der Konzentration zumindest eines Spaltprodukts des Substrats pro Zeiteinheit vorgesehen.

Erfnungsgemäß ist erkannt worden, daß sich ein Verfahren zur Bestimmung der Aktivität von Enzymen in Flüssigkeiten, bei dem einer Meßprobe auf chromatographischem Wege die mit einem Enzym korrespondierenden Enzym-Inhibitoren entzogen werden, in eine sequentielle Versuchsanordnung umsetzen läßt. Das heißt, eine Meßprobe durchläuft nacheinander verschiedene Stationen einer Versuchsanordnung, ohne daß die Meßprobe vor Beendigung des Versuchs der Versuchsanordnung entnommen werden muß und speziell behandelt werden muß. Besonders vorteilhaft in diesem Zusammenhang ist, daß die Messungen weitgehend automatisch durchgeführt werden können, indem einzelne Komponenten der Vorrichtung automatisch angesteuert und bedient werden.

In einer vorteilhaften Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist die Säule mehrfach verwendbar, d.h. es lassen sich mit einer Säule mehrere Meßproben hintereinander behandeln. Dazu herrscht in der Säule ein Überschuß an der Substanz, welche die in den Meßproben vorliegenden Enzym-Inhibitoren bindet. Die Menge bzw. der Überschuß an der Substanz bestimmen letztlich die Kapazität der Säule.

Von Vorteil ist es außerdem, wenn die Säule austauschbar ist. In diesem Falle kann einerseits eine verbrauchte Säule durch eine neue Säule ersetzt werden. Andererseits kann die erfindungsgemäße Vorrichtung dann auch für unterschiedliche Versuche präpariert werden, d.h. für die Messung von Aktivitäten unterschiedlicher Enzyme. Hierfür müssen den Meßproben jeweils unterschiedliche Enzym-Inhibitoren entzogen werden. Dementsprechend muß die Säule also mit unterschiedlichen Substanzen präpariert sein.

Im Hinblick auf eine Automatisierung des Meßverfahrens ist es vorteilhaft, wenn die Zuführeinrichtung nicht nur Zugriff auf einen Meßprobenspeicher, wie z. B. ein Probenrondell, hat sondern auch auf ein Reservoir eines Säulenpuffers. Der Säulenpuffer dient zum Nachspülen bzw. Durchspülen der Säule nach jeder Meßprobe, um ein Vermischen von unterschiedlichen Meßproben in der Säule und also eine Meßwertverfälschung zu vermeiden. Im Rahmen einer automatischen Verfahrensführung wird die Zuführeinrichtung dann also immer abwechselnd auf den Meßprobenspeicher und das Reservoir des Säulenpuffers zugreifen. Vorteilhaft ist es in diesem Zusammenhang auch, wenn der Säule nachgeschaltet eine Kontrollvorrichtung zum Überprüfen der Reinheit des aus der Säule austretenden Säulenpuffers vorgesehen ist. Eine solche Kontrollvorrichtung könnte beispielsweise photometrisch arbeiten oder auch Mittel zur Messung der Leitfähigkeit der aus der Säule austretenden Flüssigkeit umfassen.

Wie bereits erwähnt dient der Säulenpuffer zum Nachspülen der Säule, nachdem eine Meßprobe die Säule durchlaufen hat. Des weiteren dient der Säulenpuffer aber auch zur Verdünnung der Meßprobe. Zur Auswertung der Meßergebnisse und auch um definierte Versuchsbedingungen zu schaffen, ist in einer vorteilhaften Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Vorrichtung der Säule nachgeschaltet eine Meßvorrichtung zum Bestimmen der Verdünnung der Meßprobe mit dem Säulenpuffer angeordnet. Eine derartige Meßvorrichtung könnte beispielsweise Mittel zur Volumenbestimmung von Flüssigkeiten umfassen. Da in der Regel das Volumen der Meßprobe bekannt ist, reicht es, das Volumen des hinzukommenden Säulenpuffers zu bestimmen oder das Gesamtvolumen aus Meßprobe und Säulenpuffer.

Je nach Art der Meßprobe und des verwendeten Säulenpuffers kann es vorteilhaft sein auch eine Mischvorrichtung zum Herstellen einer homogenen Mischung der behandelten Meßprobe mit dem Säulenpuffer vorzusehen.

Oftmals ist es auch erforderlich, der Meßprobe, gegebenenfalls dem Säulenpuffer und dem Substrat in dem Versuchsgefäß über die Ventil/Pumpen-Anordnung zusätzlich einen Meßpuffer beizumischen, um definierte Versuchsbedingungen herzustellen. In diesem Zusammenhang erweisen sich auch Mittel zum Temperieren des Versuchsgefäßes als vorteilhaft.

Wie bereits im Zusammenhang mit dem erfindungsgemäßen Verfahren angedeutet, ist es vorteilhaft, wenn der Detektor zum Erfassen des Anstiegs der Konzentration eines Spaltprodukts des Substrats ein Fluorometer umfaßt.

In der Diagnostik ist es oftmals erforderlich, Vergleichsmessungen zwischen den Enzymaktivitäten von unbehandeltem Serum und behandeltem Serum durchzuführen. Dazu ist es vorteilhaft, wenn zwischen der Zuführeinrichtung und der Säule der erfin-

29.07.95 *M*

- 8 -

dungsgemäßem Vorrichtung mindestens ein umstellbares Ventil angeordnet ist, über das die Meßprobe alternativ über die Säule oder direkt, ohne Durchlaufen der Säule in das Versuchsgefäß leitbar ist. Auf diese Weise können sowohl Messungen an Meßproben durchgeführt werden, denen die entsprechenden Enzym-Inhibitoren entzogen worden sind, als auch Messungen an unbehandelten Meßproben.

In einer vorteilhaften Weiterbildung der erfindungsgemäßem Vorrichtung ist zusätzlich mindestens ein Ventil vorgesehen, über das zumindest der Säule und der Ventil/Pumpen-Anordnung ein Spülpuffer zum Reinigen zuführbar ist. In vorteilhafter Weise kann so die gesamte Apparatur gereinigt werden.

Schließlich sei noch darauf hingewiesen, daß die erfindungsgemäßem Vorrichtung in Verbindung mit einer Rechnereinheit automatisch betrieben werden kann, indem die Rechnereinheit sowohl das Zuführen der Meßproben und gegebenenfalls des Säulenpuffers steuert, als auch die Bestimmung der Verdünnung der Meßprobe und gegebenenfalls das Mischen und das Befüllen der Versuchsgefäße koordiniert. Außerdem kann die Rechnereinheit auch zum Erfassen und Auswerten des Anstiegs der Konzentration eines Spaltprodukts des Substrats pro Zeiteinheit verwendet werden.

Es gibt nun verschiedene Möglichkeiten, die Lehre der vorliegenden Erfindung in vorteilhafter Weise auszugestalten und weiterzubilden. Dazu ist einerseits auf die den Patentansprüchen 1 und 7 nachgeordneten Ansprüche, andererseits auf die nachfolgende Erläuterung eines Ausführungsbeispiels der Erfindung anhand der Zeichnung zu verweisen. In Verbindung mit der Erläuterung des bevorzugten Ausführungsbeispiels der Erfindung werden auch im allgemeinen bevorzugte Ausgestaltungen und Weiterbildungen der Lehre erläutert. In der Zeichnung zeigt die einzige Figur

in schematischer Darstellung den sequentiellen Aufbau einer erfindungsgemäßen Vorrichtung.

Die in der einzigen Figur dargestellte Vorrichtung ermöglicht die vollautomatische und serielle Bestimmung der Enzymaktivitäten von verschiedenen in flüssiger Form vorliegenden Meßproben. Dabei kann es sich um Körperflüssigkeiten aller Art oder auch um homogenisiertes Gewebe handeln.

Die Vorrichtung umfaßt erfindungsgemäß zur Behandlung einer Meßprobe eine Säule 1 mit einem chromatographischen Trägermaterial, wobei das Trägermaterial mit einer Substanz versetzt ist, welche in der zu untersuchenden Meßprobe vorliegende, mit mindestens einem Enzym korrespondierende Enzym-Inhibitoren bindet.

Soll beispielsweise die Aktivität des Enzyms Cathepsin H in einer Meßprobe ermittelt werden, so könnte als chromatographisches Trägermaterial der Säule 1 Sepharose-Gel verwendet werden, welches mit der Substanz Papain präpariert ist. Papain bindet die mit Cathepsin H korrespondierenden Enzym-Inhibitoren.

Dem oberen Ende der Säule 1 ist eine Zuführeinrichtung 2 zugeordnet. In dem hier dargestellten Ausführungsbeispiel handelt es sich um einen Entnahmearm 2, der alternativ auf einen Meßprobenspeicher 3 und ein Reservoir 4 für einen Säulenpuffer zugreifen kann.

Der Säule 1 bzw. dem unteren Ende der Säule 1 nachgeschaltet ist eine Ventil/Pumpen-Anordnung, mit der im dargestellten Ausführungsbeispiel mehrere Versuchsgefäß 5 mit einem Substrat und zumindest einem Teil der Meßprobe befüllbar sind.

Zum Erfassen der Aktivität von Cathepsin H in einer Meßprobe kann als Substrat H-Arg-AMC verwendet werden. Durch Einwirken des Enzyms Cathepsin H wird das Substrat H-Arg-AMC in die Spaltprodukte H-Arg und AMC aufgespalten. Da die Enzymaktivität immer proportional zur Konzentration der Spaltprodukte ist, läßt sich mit dem Anstieg der Konzentration zumindest eines Spaltprodukts des Substrats pro Zeiteinheit während einer Inkubationszeit die Enzymaktivität erfassen. Im Falle des Cathepsin H wird der Anstieg der Konzentration von AMC erfaßt. Dazu wird im Rahmen des hier erörterten Ausführungsbeispiels ein Detektor mit einem Fluorometer verwendet, der in der einzigen Figur nicht näher dargestellt ist.

Im folgenden werden nun die einzelnen Komponenten der in der einzigen Figur dargestellten Vorrichtung näher erläutert.

Wie bereits erwähnt sind verschiedene Meßproben in dem Meßproben speicher 3, der beispielsweise durch ein Probenrondell gebildet sein kann, angeordnet. Mit Hilfe des Entnahmearms 2 können die Meßproben nun vollautomatisch entnommen werden und über ein Ventil 6 der Säule 1 zugeleitet werden. Das chromatographische Trägermaterial der Säule 1 ist so präpariert, daß in der Säule 1 ein Überschuß an einer Substanz, in der Regel einem oder mehreren Enzymen, herrscht, die die gewünschten Enzym-Inhibitoren der Meßproben an sich binden können. Der Überschuß an dieser Substanz ist in der Regel so groß, daß die Säule 1 mehrfach verwendbar ist, d.h. für den Durchlauf einer größeren Anzahl von Meßproben geeignet ist. Außerdem ist die Säule 1 austauschbar, so daß sie, nach dem die Substanz in der Säule 1 verbraucht ist, durch eine neue Säule ersetzt werden kann. Die Dimensionierung und konstruktive Ausgestaltung der Säule 1 hängt einerseits von der gewünschten Kapazität der Säule 1 ab und andererseits von dem apparativen Umfeld, in dem die Säule 1 angeordnet werden soll. Die Säule 1 kann also beispielsweise mit einem großen Querschnitt und entsprechend kürzer oder auch

mit einem kleinen Querschnitt und dementsprechend länger ausgebildet sein.

Zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit der Säule 1 sollten in regelmäßigen Abständen Kontrollmessungen an Meßproben mit bekannter Enzymaktivität durchgeführt werden. Auf diese Weise kann einfach festgestellt werden, ob die Enzym-Inhibitoren bindende Substanz der Säule 1 verbraucht ist.

Um nun zu gewährleisten, daß sich die einzelnen Meßproben nicht miteinander vermischen, kann der Säule 1 alternativ zu einer Meßprobe über den Entnahmearm 2 und das Ventil 6 auch ein Säulenpuffer aus dem Reservoir 4 zugeführt werden. Dies erfolgt immer im Anschluß an das Zuführen einer Meßprobe mit Hilfe einer der Säule 1 nachgeschalteten Pumpe 7.

Dieser Pumpe 7 und also der Säule 1 nachgeschaltet ist eine Kontrollvorrichtung 8 in Form eines Photometers, mit der die Reinheit des aus der Säule 1 bzw. der Pumpe 7 austretenden Säulenpuffers überprüft werden kann. Dadurch wird gewährleistet, daß in der Säule ausschließlich Säulenpuffer vorliegt, bevor der Säule 1 eine weitere Meßprobe zugeführt wird.

Durch das Nachspülen der Säule 1 mit Säulenpuffer wird die Meßprobe, die die Säule 1 bereits durchlaufen hat, verdünnt. Der Verdünnungsgrad wird nun in einer der Säule 1 ebenfalls nachgeschalteten Meßvorrichtung 9 im Rahmen einer Volumenmessung bestimmt. Dabei ist das Volumen der Meßprobe bekannt. Erfaßt wird lediglich das Volumen des zum Spülen verwendeten Säulenpuffers. Aus dem Gesamtvolumen von Meßprobe und Säulenpuffer kann nun der Verdünnungsgrad berechnet werden.

Der Meßvorrichtung 9 nachgeschaltet ist eine Mischvorrichtung 10, mit Hilfe derer die Mischung aus Meßprobe und Säulenpuffer homogenisiert wird.

Die dabei entstehende homogene Mischung wird einem Ventil 11 zugeführt, über das sowohl diese Mischung als auch das Substrat aus einem Substratbehälter 12 und ein Meßpuffer aus einem entsprechenden Meßpufferbehälter 13 den Versuchsgefäßen 5 zugeleitet werden können. Der Meßpuffer 13 dient dabei zur Herstellung definierter Versuchsbedingungen. Alternativ oder zusätzlich können der Mischung auch weitere Lösungen, beispielsweise eine Titerlösung in Form einer speziellen Inhibitorlösung zur Konzentrationsbestimmung, zugesetzt werden. Hierfür muß die Vorrichtung dann zusätzlich entsprechende Behälter umfassen. Dem Ventil 11 sind in dem hier dargestellten Ausführungsbeispiel noch eine Pumpe 14 und ein weiteres Ventil 15 nachgeschaltet, die der Weiterleitung des nunmehr vorliegenden Gemischs aus Meßprobe, Säulenpuffer, Substrat und Meßpuffer dienen.

Die gesamte hier beschriebene Vorrichtung läßt sich temperieren. In der Regel erfolgt die Behandlung der Meßprobe zum Entziehen der Enzym-Inhibitoren bei einer Temperatur von ca. 4 °C. Insbesondere sind Mittel zur Temperierung der Versuchsgefäße 5 vorgesehen, die in der einzigen Figur allerdings nicht dargestellt sind. Die Versuchgefäße sollten zumindest während der Inkubationszeit temperierbar sein. Standardgemäß arbeitet man bei Temperaturen von ca. 37 °C. Im Rahmen spezieller Versuchsbedingungen könnte aber auch eine flexible Temperierung sinnvoll sein. Die Inkubationszeit, d.h. die Einwirkzeit der Meßprobe auf die Substrate, hängt von den unterschiedlichen Enzymen und Substraten ab und liegt in der Regel zwischen 5 und 15 Minuten.

An dieser Stelle sei angemerkt, daß es mit der erfindungsgemäßigen Vorrichtung möglich ist, einerseits redundante Messungen durchzuführen, indem in mehreren Versuchsgefäßen die Aktivität ein und desselben Enzyms einer Meßprobe bestimmt wird. Andererseits ist es bei entsprechender Präparation der Säule 1 auch möglich, die Aktivitäten unterschiedlicher Enzyme einer Meß-

probe zu bestimmen, indem unterschiedliche Substrate verwendet werden, man die behandelte Meßprobe also auf unterschiedliche Substrate einwirken läßt. Denkbar wäre schließlich auch noch die Bestimmung der Aktivitäten eines Enzyms auf unterschiedlichen Substraten.

Mit der in der einzigen Figur dargestellten Vorrichtung können auch Vergleichsmessungen durchgeführt werden, indem Meßproben durch die Säule 1 in die Versuchsgefäße 5 geleitet werden können oder über das Ventil 6, das Ventil 11, die Pumpe 14 und das Ventil 15 direkt in die Versuchsgefäße 5 geleitet werden können. Parallel zu den Messungen an Meßproben, die die Säule 1 durchlaufen haben, können also auch Messungen der Enzymaktivität an Meßproben vorgenommen werden, die die Säule 1 nicht durchlaufen haben. Damit sind sogenannte Vorher-/Nachher-Vergleichsmessungen möglich, nämlich Messungen bei Gegenwart von Enzym-Inhibitoren in der Meßproben und Messungen an von Enzym-Inhibitoren bereinigten Meßproben.

Die in der einzigen Figur dargestellte Vorrichtung umfaßt schließlich noch ein Ventil 16 über das der gesamten Apparatur ein Spülpuffer 17 zum Reinigen der Apparatur zuführbar ist.

Mit Hilfe einer Rechnereinheit 18 lassen sich die einzelnen Komponenten der erfindungsgemäßen Vorrichtung ansteuern, so z.B. die Zuführeinrichtung, so daß der Säule 1 automatisch Meßproben und Säulenpuffer zugeführt werden können. Auch die Auswertung der Meßergebnisse kann mit Hilfe der Rechnereinheit 18 erfolgen.

Insgesamt läßt sich mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens und der erfindungsgemäßen Vorrichtung eine rationelle, zumindest weitgehend automatische Meßmethode zur Bestimmung der Enzymaktivitäten von in flüssiger Form vorliegenden Meßproben realisieren.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung der Aktivität von Enzymen in Flüssigkeiten, bei dem einer Meßprobe die mit mindestens einem Enzym korrespondierenden Enzym-Inhibitoren entzogen werden und bei dem die so behandelte Meßprobe mit einem Substrat versetzt wird, wobei das Substrat durch das Einwirken des Enzyms in Spaltprodukte aufgespalten wird und der Anstieg der Konzentration zumindest eines Spaltprodukts des Substrats pro Zeiteinheit während einer Inkubationszeit erfaßt wird, dadurch gekennzeichnet, daß die Enzym-Inhibitoren der Meßprobe auf chromatographischem Wege entzogen werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Meßprobe durch eine Säule (1) mit einem chromatographischen Trägermaterial geleitet wird, wobei das Trägermaterial mit einer die Enzym-Inhibitoren bindenden Substanz versetzt ist.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die behandelte Meßprobe mit einem geeigneten Säulenpuffer definiert verdünnt wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die behandelte Meßprobe zur Herstellung definierter Versuchsbedingungen mit einem geeigneten Meßpuffer versetzt wird.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Substrat zumindest während der Inkubationszeit temperiert wird.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Anstieg der Konzentration eines der Spaltprodukte des Substrats fluorometrisch bestimmt wird.

7. Vorrichtung zur Bestimmung der Aktivität von Enzymen in Flüssigkeiten, insbesondere mit einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6,

dadurch gekennzeichnet, daß zur Behandlung einer Meßprobe eine Säule (1) mit einem chromatographischen Trägermaterial vorgesehen ist, wobei das Trägermaterial mit einer Substanz versetzt ist, welche in der Meßprobe vorliegende, mit mindestens einem Enzym korrespondierende Enzym-Inhibitoren bindet, daß dem einen Ende der Säule (1) eine Zuführeinrichtung (2) für Meßproben zugeordnet ist, daß in Flußrichtung der Meßprobe, der Säule (1) nachgeschaltet eine Ventil/Pumpen-Anordnung (7, 11, 14, 15) angeordnet ist, mit der mindestens ein Versuchsgefäß (5) mit einem Substrat und zumindest einem Teil der Meßprobe befüllbar ist, und daß ein Detektor zum Erfassen des Anstiegs der Konzentration zumindest eines Spaltprodukts des Substrats pro Zeiteinheit vorgesehen ist.

8. Vorrichtung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Säule (1) mehrfach verwendbar ist, indem ein der Kapazität der Säule (1) entsprechender Überschuß an der Substanz vorhanden ist.

9. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Säule (1) austauschbar ist.

10. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 7 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Zuführeinrichtung (2) alternativ Zugriff auf einen Meßprobenspeicher (3) oder ein Reservoir (4) eines Säulenpuffers hat.

11. Vorrichtung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß der Säule (1) nachgeschaltet eine Kontrollvorrichtung (8) zum Überprüfen der Reinheit des aus der Säule (1) austretenden Säulenpuffers vorgesehen ist.

12. Vorrichtung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Kontrollvorrichtung (8) photometrisch arbeitet.

13. Vorrichtung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Kontrollvorrichtung Mittel zur Messung der Leitfähigkeit von Flüssigkeiten umfaßt.

14. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 10 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß der Säule (1) nachgeschaltet eine Meßvorrichtung (9) zum Bestimmen der Verdünnung der Meßprobe mit Säulenpuffer angeordnet ist.

15. Vorrichtung nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Meßvorrichtung (9) Mittel zur Volumenbestimmung von Flüssigkeiten umfaßt.

16. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 10 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß der Säule (1) nachgeschaltet eine Mischvorrichtung (10) zum Herstellen einer homogenen Mischung der behandelten Meßprobe mit Säulenpuffer angeordnet ist.

17. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 7 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß der Meßprobe, ggf. dem Säulenpuffer und dem Substrat in dem Versuchsgefäß (5) über die Ventil/Pumpen-Anordnung (11, 14, 15) ein Meßpuffer zum Herstellen definierter Versuchsbedingungen beimischbar ist.

18. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 7 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß der Detektor ein Fluorometer umfaßt.

19. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 7 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß Mittel zum Temperieren des Versuchsgefäßes (5) vorgesehen sind.

20. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 7 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen der Zuführeinrichtung (2) und der Säule (1) mindestens ein umstellbares Ventil (6) angeordnet ist, über das die Meßprobe alternativ über die Säule (1) oder direkt, ohne Durchlaufen der Säule (1) in das Versuchsgefäß (5) leitbar ist.

21. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 7 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein Ventil (16) vorgesehen ist, über das zumindest der Säule (1) und der Ventil/Pumpen-Anordnung ein Spülpuffer zum Reinigen zuführbar ist.

22. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 7 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß eine Rechnereinheit (18) vorgesehen ist zum automatischen Betreiben und Steuern zumindest der Zuführung der Meßproben und ggf. des Säulenpuffers, ggf. der Bestimmung der Verdünnung der Meßprobe und ggf. des Mischens, des Befüllens der Versuchsgefäße (5) und des Erfassens und Auswertens des Anstiegs der Konzentration zumindest eines Spaltprodukts des Substrats pro Zeiteinheit.

Z u s a m m e n f a s s u n g

Vorgeschlagen werden ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Bestimmung der Aktivität von Enzymen in Flüssigkeiten, die eine weitgehende Automatisierung des Meßvorganges ermöglichen. Die Vorrichtung zur Durchführung dieses Verfahrens umfaßt zur Behandlung einer Meßprobe eine Säule (1) mit einem chromatographischen Trägermaterial, wobei das Trägermaterial mit einer Substanz versetzt ist, welche in der Meßprobe vorliegende, mit mindestens einem Enzym korrespondierende Enzym-Inhibitoren bindet. Dem einen Ende der Säule (1) ist eine Zuführeinrichtung (2) für Meßproben zugeordnet. In Flußrichtung der Meßprobe, der Säule (1) nachgeschaltet ist eine Ventil/Pumpen-Anordnung (7, 11, 14, 15) angeordnet, mit der mindestens ein Versuchsgefäß (5) mit einem Substrat und zumindest einem Teil der Meßprobe befüllbar ist. Das Substrat wird durch das Einwirken des Enzyms in Spaltprodukte aufgespalten. Mit Hilfe eines Detektors wird der Anstieg der Konzentration zumindest eines Spaltprodukts des Substrats pro Zeiteinheit während einer Inkubationszeit erfaßt.

(Fig.)

29.07.95

21

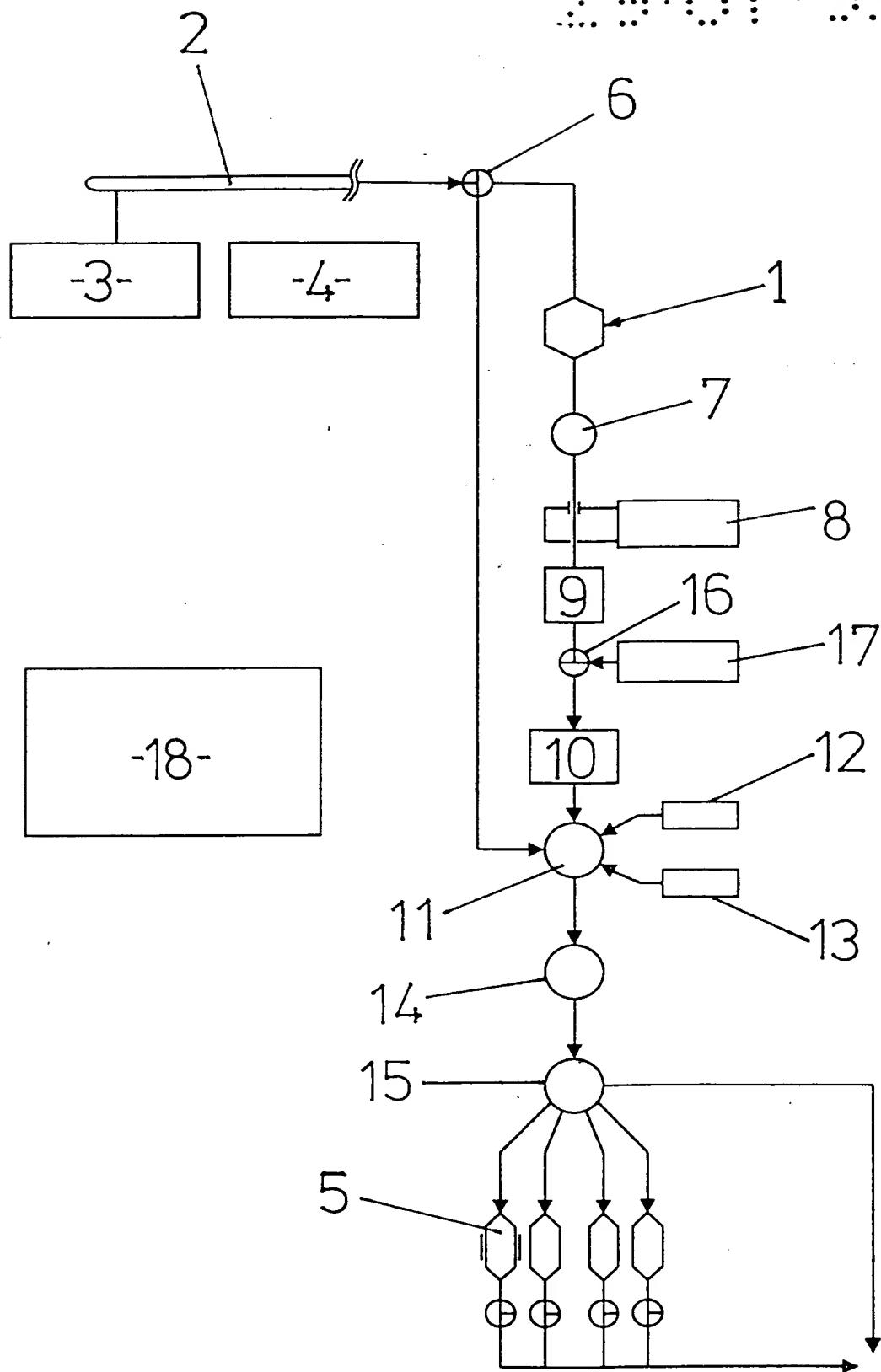
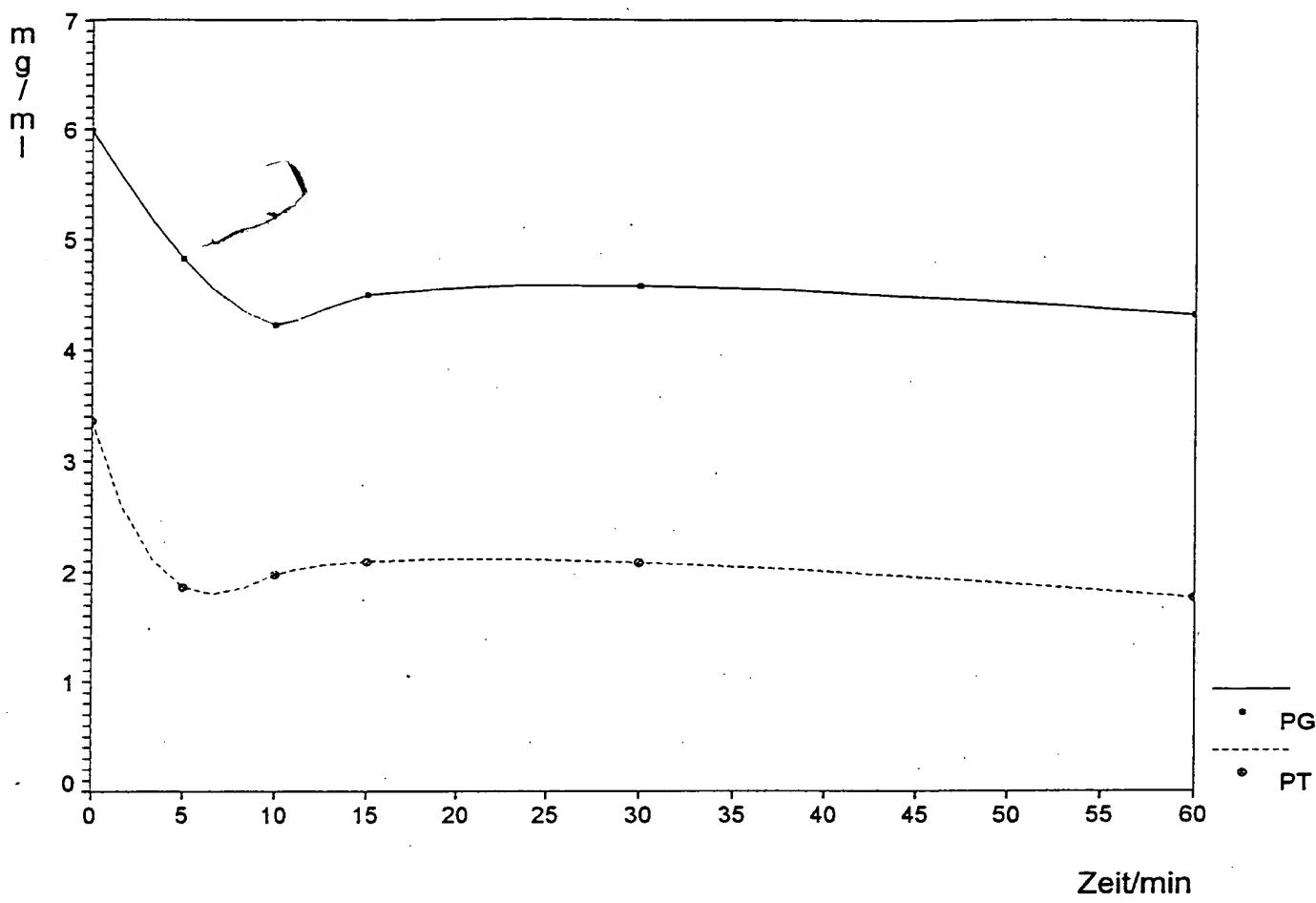


Fig.

Abb. 7: Proteinmenge



LEGENDE: PG: Proteinmenge des unbefallenen Lungengewebes vor bzw. nach dem Inhibitorentzug.

PT: Proteinmenge des tumorbefallenen Lungengewebes vor bzw. nach dem Inhibitorentzug.

X-Achse: Zeitlicher Verlauf in Minuten; 0 min entspricht dem Zustand vor, die weiteren Punkte entsprechen dem Zustand nach einem Inhibitorentzug.

Y-Achse: Proteinmenge in mg/ml.

Abb.8: Kaplan-Meier-Kurve (Überlebenskurve)

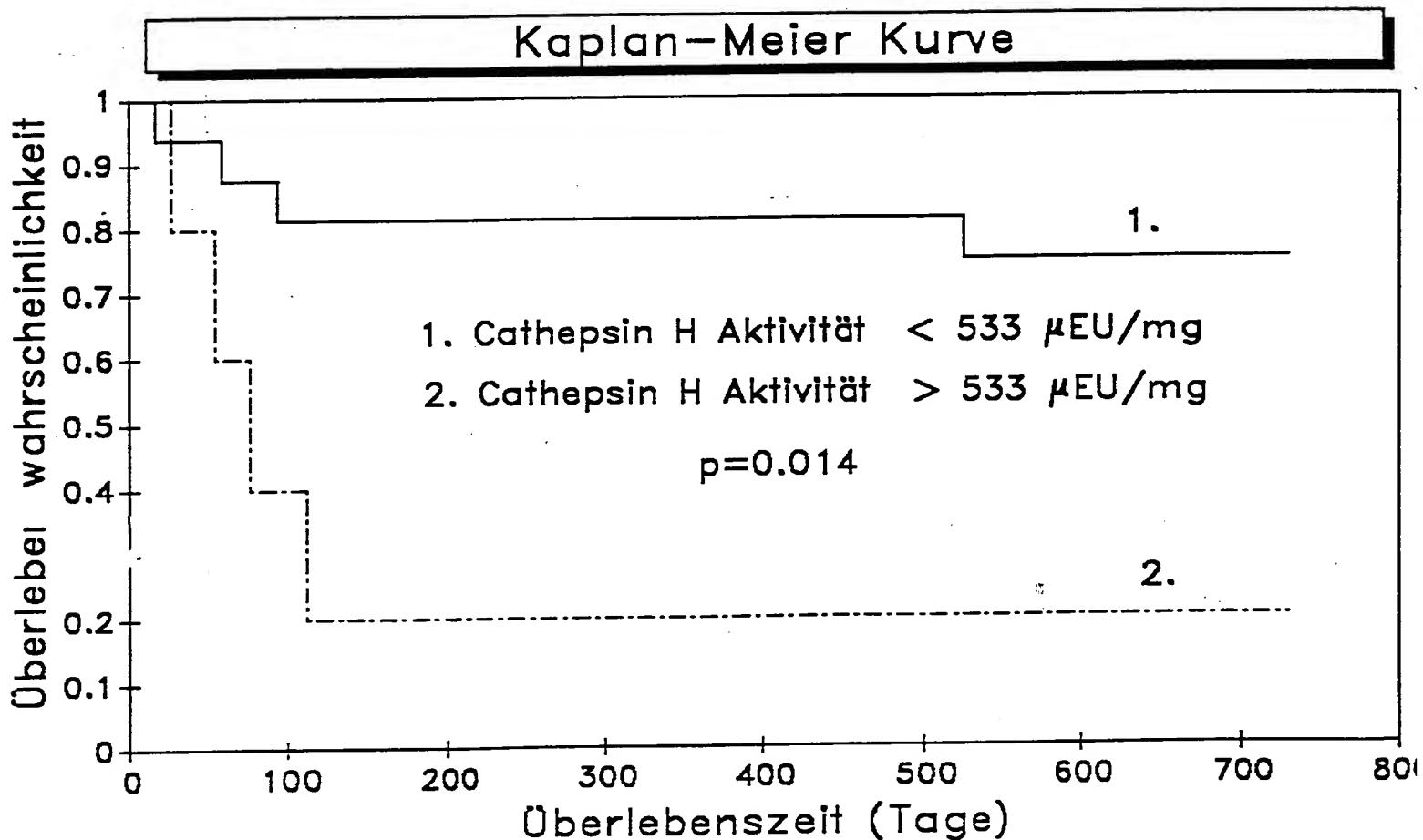
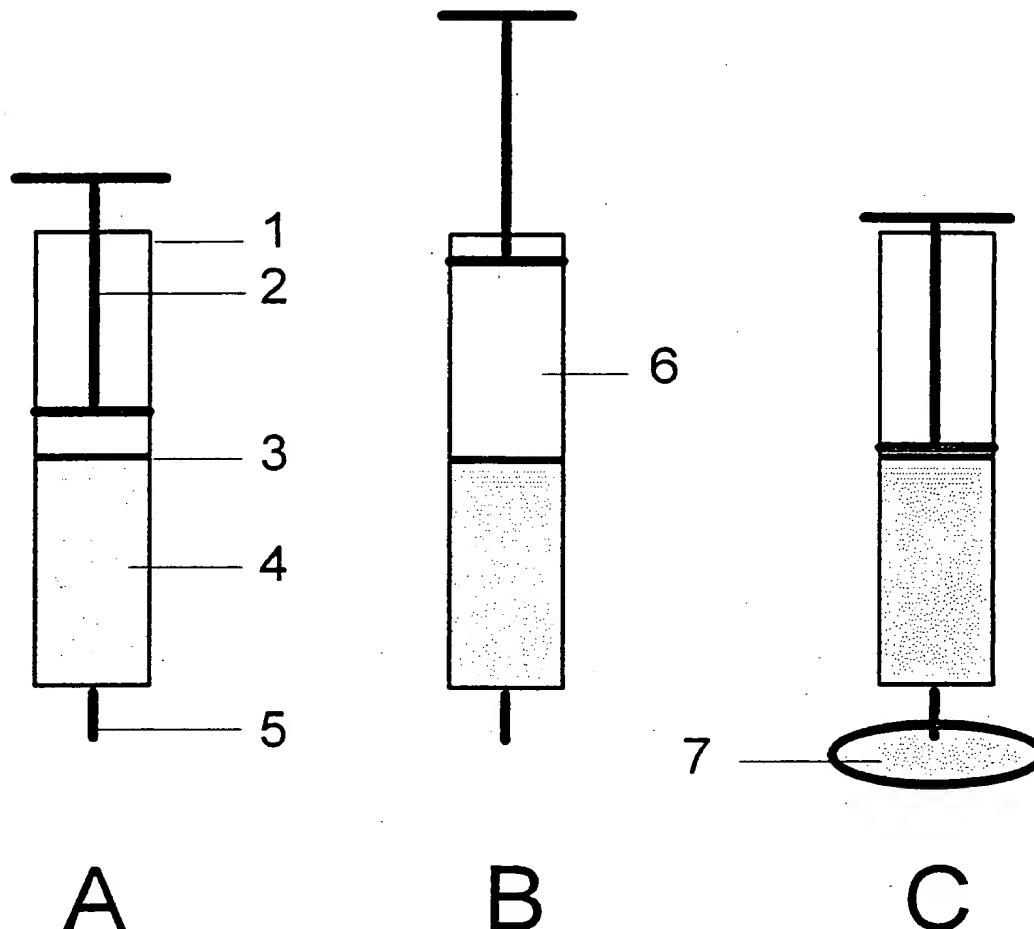


Abb.9: Schnelltest-Vorrichtung



LEGENDE:

- A: Zustand vor dem Gebrauch
- B: Zustand nach dem Einziehen der Probe
- C: Zustand nach dem Einbringen der Probe in ein Reaktionsbehältnis.

- 1: Spritze
- 2: Spritzenstempel
- 3: Mikrofilter
- 4: Chromatographisches Trägermaterial mit an dieses gebundenen Enzymen
- 5: Öffnung der Spritze zum Einziehen und Ausbringen der Probe, mit Mikrofilter versehen
- 6: Flüssigkeitsgefüllter Raum
- 7: Reaktionsbehältnis